

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität

Die Beeinflussung verschiedener intrathrombozytärer
Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels durch Papaverin

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Manfred Schmidt
aus Arnsburg

M a i n z

1972



Dekan: Professor Dr. A. Mayet
Referent: Professor Dr. W. Ohler
Korreferent: Professor Dr. H.P. Wolff

I. Einleitung

1. Vorversuche	1
1.1. Aufgabe der Vorversuche	1
1.2. Methode der Vorversuche	2
1.3. Durchführung der Vorversuche	3
1.4. Ergebnis der Vorversuche	5

II. Methode

A. Enzymmessungen	7
1. Aufgabe der Versuche	7
2. Die Plasmasubtraktionsmethode	8
3. Die untersuchten Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels	9
4. Durchführung der Versuche	10
4.1. Versuchskonzeption und -aufbau	10
4.2. Bearbeitung des Zitratblutes	13
4.3. Die photometrische Enzymaktivitätsbestimmung	15
4.4. Berechnung der Enzymaktivitäten	17
B. Statistische Methode	18
1. Einfache Datenbeschreibung	18
2. Statistische Verfahren	19
2.1. Die Messgenauigkeit der angewandten Methode	19
2.2. Beeinflussung der Thrombozytenzahl durch die Gegenwart von Papaverin	20
2.3. Die Aenderung der Enzymaktivität in Gegenwart von Papaverin	21

III. Ergebnisse

1. Grundlegende Daten	23
2. Ueberprüfung der angewandten Methode	24
3. Beeinflussung der Thrombozytenzahl durch Papaverin	25
4. Enzymaktivitätsänderung in Gegenwart von Papaverin	26

IV. Diskussion der Ergebnisse 29

V. Zusammenfassung 35

VI. Literaturverzeichnis 36

VII. Lebenslauf

I. Einleitung

In einer Mitteilung von MARKWARDT (14) wird beschrieben, dass folgende Thrombozytenfunktionen "bei Anwesenheit von Papaverin in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-4} M deutlich gehemmt oder völlig aufgehoben werden":

- a) die Adhäsivität der Thrombozyten an Glasoberflächen,
- b) die durch ADP bewirkte Aggregation,
- c) die durch Thrombin ausgelöste visköse Metamorphose und
- d) die durch Thrombin und andere proteolytische Fermente bewirkte Freisetzung von Serotonin, Histamin und ATP.

An anderer Stelle gibt MARKWARDT (15) der Vermutung Ausdruck, dass die durch Papaverin bewirkten Beeinträchtigungen der Plättchenfunktionen durch eine Hemmung des Thrombozytenstoffwechsels zustande kommen könnte. Hierbei könnten auch isolierte inhibierende Papaverinwirkungen auf einzelne Enzyme wirksam sein, wie das von anderen Aggregationshemmern berichtet wurde (22). In der vorliegenden Arbeit soll daher dieser Vermutung nachgegangen werden.

1. Vorversuche

1.1. Aufgabe der Vorversuche

In den Vorversuchen sollte geprüft werden, ob das in den folgenden Hauptversuchen zur Anwendung kommende thrombozytenreiche Plasma, das gemäss der von OHLER eingeführten Plasmasubtraktionsmethode (19) hergestellt wurde, sich in einem

der von MARKWARDT beschriebenen Versuche (14) ebenso verhielt wie die von ihm verwandte Thrombozytensuspension. Denn nur wenn gezeigt werden kann, dass sich die Blutplättchen eines thrombozytenreichen Plasmas prinzipiell gleichartig verhalten wie die Thrombozyten in einer Tyrodelösung, die MARKWARDT bei seinen Versuchen (14) verwendete, können die Resultate der später beschriebenen Hauptversuche zur etwaigen Erklärung der MARKWARDT'schen Beobachtungen herangezogen werden.

1.2. Methode der Vorversuche

Ein einfacher Versuch, mit dessen Hilfe diese Frage beantwortet werden konnte, ist der von MARKWARDT angegebene Glasfrittenversuch (14).

Dabei dient die Adhäsivität von Thrombozyten an rauen Oberflächen als Masstab für ihre Funktionstüchtigkeit. Als rauhe Oberfläche fungiert hierbei eine sogenannte Glasfritte bzw. ein Glasfiltergerät, das aus einer Filterplatte besteht, die in einen Glaszylinder eingesetzt ist. Die Filterplatte ist ein aus zerkleinertem und gesiebttem Glas zu Plattengestalt gesinterter Körper, der porös ist und Poren definierter Weite besitzt. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden drei hintereinandergeschaltete Glasfritten D2 (Jenaer Glaswerke Schott & Gen., Mainz) mit einer Porenweite von 40 - 90 μ m verwendet.

Bei diesem Versuch durchläuft eine Thrombozytensuspension bzw. ein thrombozytenreiches Plasma drei hintereinandergeschaltete Glasfritten, wobei vor und nach der Passage die Thrombozytenzahl bestimmt wird. Nach MARKWARDT soll es bei der Passage der Plättchensuspension durch die Fritten wegen

ihres Adhäsivitätsvermögens zu einer Dezimierung ihrer Zahl um 50 - 60 % kommen, wogegen der Zusatz von 10^{-4} M Papaverin eine Verminderung der Thrombozytenzahl von nur 10 - 15 % bewirken soll (14). Demnach hätten die Blutplättchen durch die Anwesenheit von Papaverin einen Teil ihrer Fähigkeit, an rauen Oberflächen haften zu bleiben, verloren.

1.3. Durchführung der Vorversuche

Für jeden Versuch wurden 120 ml Zitratblut im Verhältnis 1:10 von einem gesunden Spender abgenommen. Insgesamt wurden fünf Versuche unternommen.

Das gewonnene Blut wurde 2 - 3 mal über 5 bis 8 min bei 500 Umdrehungen/min zentrifugiert, wobei zwischendurch jeweils der Ueberstand abgehebert wurde. Das auf diese Weise gewonnene Plasma wurde noch ein- oder zweimal zentrifugiert, um die etwa noch vorhandenen Erythrozyten, die sich gut sichtbar am Reagenzglasboden absetzen, aus dem Plasma zu entfernen.

Auf diese Weise wurden ca. 45 ml thrombozytenreiches erythrozytenfreies Plasma erhalten. In der Folge wurde dieses Plasma gleichmässig auf sieben Reagenzgläser verteilt und unter Auslassung des ersten Reagenzglases den übrigen sechs Reagenzgläsern jeweils soviel Papaverinum sulfuricum hinzugesetzt, dass ein Plasma ohne Papaverin und sechs Plasmen mit aufsteigenden Papaverinkonzentrationen erhalten wurden. Aus der folgenden Tabelle sind die zur Erreichung der verschiedenen Papaverinkonzentrationen verwendeten Mengen ersichtlich:

Reagenz- glas	Plasma (ml)	Papaverin (μ l)	Papaverinkonzentration (M)
1	5,0	0	0
2	4,69	5	5×10^{-5}
3	4,69	10	10^{-4}
4	5,64	30	$2,5 \times 10^{-4}$
5	5,64	60	5×10^{-4}
6	5,64	90	$7,5 \times 10^{-4}$
7	5,64	120	10^{-3}

Tabelle 1. Verteilung der Papaverinmengen auf verschiedene Plasmamengen zur Erreichung aufsteigender Papaverinkonzentrationen

Im Gegensatz zu MARKWARDT, der die von ihm verwandte Plättchensuspension einmal die drei Glasfritten passieren liess (14), mussten unsere Plasmen jeweils die Glasfritten zweimal hintereinander durchlaufen. Dies war nötig, um ein deutlicheres Ergebnis zu erhalten. Der Charakter des Versuchs wurde dabei nicht verändert.

Vor und nach der Passage wurde von jedem Plasma eine Probe zur Bestimmung seiner Thrombozytenzahl entnommen. Zwischen den Passagen wurden die Glasfritten mit destilliertem Wasser mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe gesäubert und dann getrocknet.

Damit keines der Plasmen eine besondere Behandlung erfuhr, wurde die Reihenfolge der Glasfritten-Passagen und Thrombozytenzählungen im Laufe der fünf durchgeführten

Versuche willkürlich geändert.

1.4. Ergebnis der Vorversuche

In jedem der fünf Versuche erhielten wir entsprechend der Anzahl der Thrombozytenzahlbestimmungen, die in den sieben Plasmen jeweils vor und nach der Frittenpassage vorgenommen worden waren, sieben Zahlenpaare. Die Differenzen zwischen den beiden Zahlen eines jeden Zahlenpaares entsprechen den in den Glasfritten hängengebliebenen Thrombozyten. Rechnet man die Differenzen in Relativprozent um, so erhielt man zu jeder Papaverinkonzentration die Prozentzahl der adhäsiven Blutplättchen; dabei wurde die Adhäsivität der Thrombozyten ohne Papaverin gleich 100 % gesetzt.

Wie aus der Tabelle 2. hervorgeht, nimmt mit steigender Papaverinkonzentration die Adhäsivität der Blutplättchen ab.

Papaverin- Konzentration (M)	Adhäsivität der Thrombozyten in rel.-%					Durchschnitts- werte in	
	Versuche					rel.-%	abs.-%
	1	2	3	4	5		
0	100	100	100	100	100	100	64
5×10^{-5}	50,7	54,7	17,2	74,4	85,0	56,4	35,8
10^{-4}	71,6	53,0	6,0	44,6	57,7	46,6	26,5
$2,5 \times 10^{-4}$	15,0	16,2	13,1	19,9	28,0	18,8	12,2
5×10^{-4}	20,9	14,0	7,3	36,1	15,0	18,7	11,5
$7,5 \times 10^{-4}$	6,0	17,3	2,3	26,6	7,5	11,9	7,4
10^{-3}	44,8	33,3	24,5	14,2	12,6	25,9	10,0

Tabelle 2. Abnahme der Thrombozytenadhäsivität mit steigender Papaverinkonzentration

Die graphische Darstellung der Durchschnittswerte in rel.-% aus Tabelle 2. zeigt mit zunehmender Papaverinkonzentration einen langsamen Abfall der Adhäsivitätskurve mit einem Tiefpunkt bei $7,5 \times 10^{-4}$ M Papaverin; danach steigt die Kurve wieder mässig an (Abb. 1.).

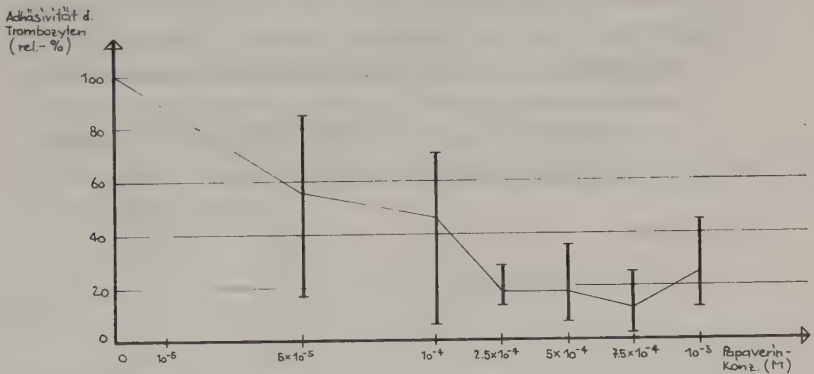


Abb. 1. Darstellung des Adhäsivitätsverlustes von Thrombozyten mit steigender Papaverinkonzentration

Beim Vergleich der von MARKWARDT angegebenen Zahlen für die adhäsiven Blutplättchen in Anwesenheit von Papaverin in einer Konzentration von 10^{-4} M mit den von uns ermittelten Zahlen fällt auf, dass geringe Unterschiede bestehen. So fand MARKWARDT ohne Papaverin einen Thrombozytenverlust von 50 - 60 abs.-%, mit Papaverin von 10 - 15 abs.-%. Unser Ergebnis war für den ersten Fall 64 abs.-%, für den zweiten Fall 26,5 abs.-% als Mittelwert von fünf Versuchen. Dieser zahlenmässige Unterschied mag zum einen in der Unterschiedlichkeit des verwendeten

Plättchenmediums, zum andern darin begründet liegen, dass MARKWARDT's Thrombozytensuspension drei Glasfritten einmal (14), unser plättchenreiches Plasma dieselben aber zweimal passierte und die dadurch bedingte höhere mechanische Beanspruchung der Blutplättchen zu einem grösseren Thrombozytenverlust führte.

Damit ist gezeigt worden, dass der von MARKWARDT angegebene Adhäsivitätsverlust von Thrombozyten einer Thrombozytensuspension auch bei Thrombozyten eines plättchenreichen Plasmas festzustellen ist, wenn zuvor Papaverin zugesetzt worden war. Somit ist es erlaubt, die Ergebnisse der an späterer Stelle beschriebenen Enzymmessungen in Gegenwart von Papaverin (Teil II.) zur Diskussion der von MARKWARDT gemachten Feststellungen (14) heranzuziehen.

II. Methode

A. Enzymmessungen

1. Aufgabe der Versuche

Es sollte der Vermutung MARKWARDT's (15) nachgegangen werden, wonach die in Gegenwart von Papaverin nachweisliche Hemmung bestimmter Plättchenfunktionen (Teil I. dieser Arbeit) möglicherweise auf die Inhibition eines oder mehrerer Enzyme des intrathrombozytären Kohlenhydratstoffwechsels zurückzuführen sei. Würden nämlich ein oder mehrere Glykolyseenzyme durch die Gegenwart von Papaverin in ihrer Aktivität beeinträchtigt, dann könnte man sich vorstellen, dass die intrathrombozytäre Energiebereit-

stellung nicht oder nur in ungenügender Weise stattfände und es auf diese Weise zu dem oben besprochenen Verlust der Thrombozytenfunktionen kommen könnte.

2. Die Plasmasubtraktionsmethode

Zur Bestimmung der intrathrombozytären Glykolyseenzyme bot sich die von OHLER (19) angegebene Plasmasubtraktionsmethode an. Sie besitzt gegenüber der früher angewandten Methode der Thrombozytenwaschung zwei Vorteile:

1. grössere Schonung der sehr vulnerablen Blutplättchen durch Belassung in ihrem Plasmamilieu
2. Verzicht auf die schwierige und zeitraubende Waschung der Thrombozyten

Bei der Plasmasubtraktionsmethode werden durch mehrmaliges vorsichtiges Zentrifugieren die Erythrozyten und Leukozyten eines Zitratblutes eliminiert. Da das erhaltene plättchenreiche Plasma sowohl die zu bestimmende Enzymaktivität der Thrombozyten als auch die plasmaleigene Enzymaktivität enthält, wird zuerst diese Gesamtaktivität bestimmt, danach nach Abzentrifugierung der Thrombozyten die plasmaleigene Enzymaktivität. Die Enzymaktivität der Thrombozyten ergibt sich aus der Differenz der Gesamt-enzymaktivität und der plasmaleigenen Enzymaktivität. Die Werte nach dieser Methode fallen wegen der grösseren Schonung der Blutplättchen höher aus als nach der herkömmlichen Methode.

3. Die untersuchten Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels

Die Aktivitäten folgender sieben Glykolyseenzyme wurden auf photometrischem Wege gemessen (in Klammern ihre Abkürzungen):

- | | |
|---|------------|
| 1. Di-Phosphat-Fruktoaldolase | (Aldolase) |
| 2. Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase | (GAPDH) |
| 3. 3-Phosphoglyzerat-1-Kinase | (3-PGK) |
| 4. 3-Phosphat-Glyzeromutase | (3-PGM) |
| 5. Enolase | (Enolase) |
| 6. Pyruvatkinase | (PK) |
| 7. Laktatdehydrogenase | (LDH) |

Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch im Gerät "Eppendorf" bei einer Wellenlänge von 366 m μ in einem auf 25 °C erwärmten Küvettenhalter bei pH 7,5 gemessen. Es kamen dabei die Testansätze folgender Autoren in Modifikationen von WALLER (25) zur Anwendung:

1. Aldolase nach BUECHER, LUH und PETTE, 1964 (3)
2. GAPDH nach DELBRUECK, ZEBE und BUECHER, 1959 (4)
3. 3-PGK nach VOGELL und Mitarbeiter, 1959 (24)
4. 3-PGM nach WALLER, 1964 (29)
5. Enolase nach BUECHER, 1955 (2)
6. PK nach BEISENHERZ und Mitarbeiter, 1953 (1)
7. LDH nach KUBOWITZ und OTT, 1943 (9)

Alle Enzyme und Substrate, die zur Herstellung der Testzusammensetzungen nötig waren, waren Präparate der Firma Boehringer, Mannheim (Biochemica-Reagentien).

4. Durchführung der Versuche

4.1. Versuchskonzeption und -aufbau

Das Versuchskonzept sah vor, aus dem Zitratblut eines Spenders ein plättchenreiches Plasma herzustellen, dieses in zwei gleiche Teile A und B zu teilen, wobei dem Teil A Papaverin, dem Teil B die gleiche Menge physiologische Kochsalzlösung zugesetzt wurde, und in beiden Plasmen auf photometrischem Wege die Enzymaktivität zu bestimmen. Wenn genügend viele Spenderplasmen auf diese Art untersucht waren, liess sich durch Vergleich der Enzymaktivität der Plasmen A und B eine Aussage darüber machen, ob zwischen den Enzymaktivitäten beider Plasmen ein mehr als zufälliger Unterschied bestand.

Um eine statistische Ueberprüfung durchführen zu können, waren wir darauf bedacht, möglichst viele Messwerte an jedem Versuchstag zu erhalten, um den Fehler des Messsystems so klein wie möglich zu halten. Dieser Messfehler resultiert aus dem möglichen nicht ganz gleichen Verhalten der Messapparatur an verschiedenen Tagen und einer möglichen geringen Variation der Testzusammensetzung und Plasmen im Laufe von Tagen. Pro Spenderblut sollten sieben Glykolyseenzyme dreimal ohne und dreimal mit Papaverin bestimmt werden, um ein hinreichend genaues Ergebnis zu erhalten. Dies war aber arbeitstechnisch nicht möglich, da mehr als vier Enzyme an einem Versuchstag nicht gemessen werden konnten. Daher kamen wir zu folgender Einteilung des Versuchsablaufs:

Die Bestimmung der sieben Enzyme wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommen, indem an beiden Tagen zu Beginn der Messungen am Morgen die entsprechende Menge Blut vom gleichen Spender abgenommen wurde. So bestimmten wir am ersten Tag vier, am zweiten drei Enzyme im gleichen Plasma. Diese Prozedur führten wir mit insgesamt fünf Spendern an zehn Tagen durch.

Als Spender fungierten fünf etwa gleichaltrige, gesunde Personen (22 bis 25 Jahre alt), von denen eine weiblichen, vier männlichen Geschlechtes waren. Die Blutentnahme fand immer morgens zwischen 7^h und 8^h statt. Zur Schonung der Thrombozyten wurden Plastikspritzen mit grosskalibrigen Kanülen verwendet. Die dabei gewonnenen 60 ml Zitratblut im Verhältnis 1:10 wurden gemäss der Plasmasubtraktionsmethode (19) zentrifugiert und hierdurch ein plättchenreiches Plasma erhalten. Nach Teilung dieses Plasmas in zwei gleiche Teile A (mit Papaverin) und B (ohne Papaverin) wurden A und B in später geschilderter Art und Weise zu vier photometrisch verwendbaren Plasmen weiterverarbeitet:

- | | | | |
|-------|---|----------------------------|----------------------|
| A_1 | = | Thrombozytenreiches Plasma | mit Papaverinzusatz |
| A_2 | = | Zellfreies Plasma | |
| B_1 | = | Thrombozytenreiches Plasma | ohne Papaverinzusatz |
| B_2 | = | Zellfreies Plasma | |

Die Differenzen zwischen A_1 und A_2 bzw. B_1 und B_2 entsprechen dabei den gesuchten Enzymaktivitäten der Thrombozyten in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Papaverin.

Bei der Wahl der Papaverinkonzentration im Plasma A wurde das Ergebnis der Vorversuche (siehe I.1.4, S.6) zugrunde gelegt. Wir fügten dem Plasma Papaverinum sulfuricum (KNOLL AG, Ludwigshafen) in einem Verhältnis von 1:100 hinzu. In der Praxis bedeutete das, dass einer Plasmamenge in ml zehnmal soviel Papaverin in μl appliziert wurde. Dieses Vorgehen erwies sich als einfach durchführbar und entsprach einer Papaverinkonzentration von etwa $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ einer Konzentration, die nach den Vorversuchsergebnissen einen grossen Adhäsivitätsverlust der Blutplättchen bewirkte (s. Abb. 1, S.6).

Die Enzymaktivitäten der Plasmen A_1 und B_1 wurden jeweils doppelt bestimmt, um den Messfehler zu verringern. Für die Plasmen A_2 und B_2 reichte dagegen wegen ihrer geringen Enzymaktivität die Einfachbestimmung aus.

Abb. 2. zeigt den beschrifteten Weg vom Zitratblut bis zum Erhalt des Wertes der Enzymaktivität.

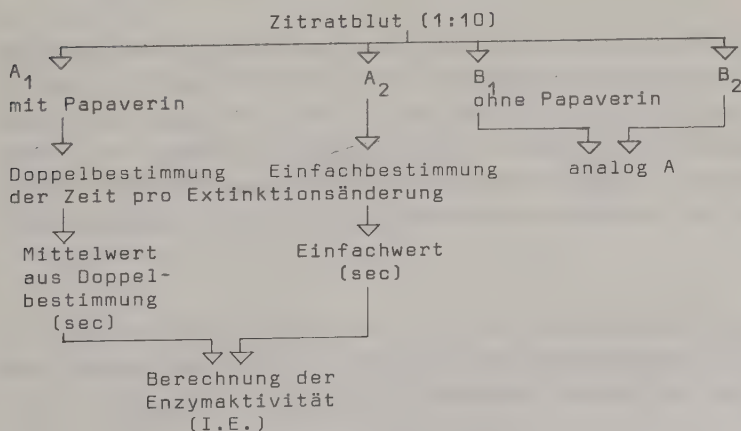


Abb. 2. Schema zur Verdeutlichung des Weges vom Zitratblut bis zum Erhalt des Enzymaktivitätswertes.

Beim Zentrifugieren und bei der weiteren Behandlung der Plasmen wurden stets Polyäthylenröhrchen benutzt, weil diese infolge ihrer glatten Oberfläche eine grösstmögliche Schonung der leicht verletzlichen Blutplättchen gewährleisteten.

4.2. Bearbeitung des Zitratblutes

Die vom Spender abgenommenen 60 ml Zitratblut (1:10) wurden zunächst für etwa eine halbe Stunde in den Kühlschrank gestellt, da abgekühltes Blut beim Zentrifugieren erfahrungsgemäss besser sedimentiert als frisch gewonnenes. Zugleich wird die Stoffwechselaktivität reduziert, die Thrombozyten sind gegenüber äusseren Einflüssen weniger anfällig. Danach zentrifugierten wir das Blut zwei- bis dreimal über 5 bis 8 min bei 500 Umdrehungen/min mit zwischenzeitlichem Abhebern des Plasmaüberstandes (s. auch I.1.3, S. 3). Dabei wurden 15 bis 20 ml Plasma gewonnen, das durch ein- oder zweimaliges Nachzentrifugieren von den noch vorhandenen Erythrozyten befreit wurde.

Nachdem dieses plättchenreiche, erythrozytenfreie Plasma in zwei gleiche Portionen von 7,5 ml geteilt worden war, wurde der ersten Portion 7,5 μ l Papaverinum sulfuricum KNOLL, der zweiten Portion die gleiche Menge physiologische Kochsalzlösung zugesetzt. Die erste mit Papaverin versetzte Plasmaportion bezeichnen wir fortan als Plasma A, die zweite als Plasma B.

In beiden Plasmen wurde jetzt mit der direkten Zählmethode nach LUEDIN und FEISSLY (4a) durch Fünffachbestimmung die Thrombozytenzahl ermittelt. Hiernach wurden die beiden

Plasmen A und B nochmals geteilt, um die nach der Plasmasubtraktionsmethode (19) zur photometrischen Messung notwendigen Plasmen herzustellen. Der eine Teil des Plasmas A bzw. B wurde der Thrombozytolyse zugeführt (s. Tab. 3). Dieses Plasma, als A_1 bzw. B_1 bezeichnet, enthielt somit die Enzymaktivitäten der Thrombozyten wie auch der plasmäeigenen Enzyme.

Der verbliebene Teil der Plasmen A bzw. B wurde durch zweimaliges Zentrifugieren bei 3.500 Touren über 15 min mit zwischenzeitlicher Verwerfung des Sediments zellfrei gemacht und dann ebenfalls mit dem Thrombozytolyseansatz versetzt (s. Tab. 3).

	Plasmen A_1 bzw. B_1	A_2 bzw. B_2
Plasma A bzw. B	4,0 ml	
Zentrifugat aus A bzw. B (2x15 min bei 3.500 U/min)		2,0 ml
Aqua dest.	2,0 ml	1,0 ml
TRAP-Puffer	1,4 ml	0,7 ml
Digitonin-Lösung	0,6 ml	0,3 ml
zusammen	8,0 ml	4,0 ml

Tab. 3. Weiterverarbeitung der Plasmen A und B zu den vier photometrisch verwendbaren Testansätzen A_1 , A_2 , B_1 und B_2

Die Ansätze wurden für eine Stunde in den Kühlschrank gestellt und danach noch einmal über 10 min bei 3.500 Touren zentrifugiert, so dass sämtliche Zelltrümmer aus den Plasmen

entfernt waren. Die auf diese Weise erhaltenen Plasmaansätze konnten zur späteren photometrischen Messung verwendet werden.

4.3. Die photometrische Enzymaktivitätsbestimmung

Unter Enzymaktivität versteht man den Umsatz von Substrat pro Zeiteinheit. Die Einheit der Enzymaktivität ist die "Internationale Einheit" (I.E.); sie ist definiert als

$$1 \text{ I.E.} = \frac{1 \text{ } \mu\text{mol Substratumsatz}}{\text{min}} \quad \text{bei } 25^{\circ}\text{C und pH 7,5}$$

Bei einer enzymatischen Reaktion ist die Enzymkonzentration für den Reaktionsablauf geschwindigkeitsbestimmend, wenn Substrat und Coenzym im Ueberschuss vorhanden sind. Der Verbrauch an Coenzym ist dabei ein Mass für die Enzymaktivität.

Im Photometer kann dieser Verbrauch an Coenzym bei der für dieses Coenzym charakteristischen Wellenlänge als Extinktionsänderung pro Zeiteinheit gemessen werden.

Bei den Enzymmessungen benutzten wir einen Photometer "Eppendorf", dessen Küvettenhalter von 25°C temperaturkonstantem Wasser durchströmt wurde, so dass die drei Küvetten und ihr Inhalt der geforderten Temperatur entsprachen.

Da in allen Fällen die Enzymwerte über die Messung des NADH_2 gefunden wurden, fanden alle Messungen bei einer Wellenlänge von $366 \text{ } \mu\text{m}$ (Filter 366) statt.

Als Testzusammensetzungen kamen die von WALLER (25) modifizierten Testansätze zur Anwendung (s. auch II.3., S. 9). Die benötigten Enzyme und Substrate wurden in Form der handelsüblichen Substanzen verwendet (Biochemica-Reagentien, Boehringer, Mannheim).

Die zur Bestimmung einer Enzymaktivität nötige Messung der Zeit für die Extinktionsänderung wurde folgendermaßen vorgenommen:

Nach der Beschickung der drei Photometerküvetten mit dem Testansatz versetzte man die erste Küvette mit der jeweils vorgeschriebenen Menge Plasma A_1 , mischte sofort und bestimmte fünfmal hintereinander die Zeit, die für eine Extinktionsänderung von 0,50 bzw. 0,25 benötigt wurde. Auch in der zweiten Küvette wurde mit Plasma A_1 gemessen. Die dritte Küvette diente der Bestimmung von Plasma A_2 . Im nächsten Durchgang wurden in analoger Weise die Plasmen B_1 und B_2 gemessen.

Von den jeweils ermittelten fünf Zeitwerten wurden die Durchschnittswerte berechnet. So erhielt man je zwei Werte für A_1 bzw. B_1 und je einen Wert für A_2 bzw. B_2 . Aus den Doppelwerten von A_1 bzw. B_1 wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Der Mittelwert von A_1 und der Einfachwert von A_2 (das gleiche gilt für B_1 und B_2) erlaubten es jetzt, die Enzymaktivität zu bestimmen. Mit den A-Werten wurden die Enzymaktivitäten in Gegenwart von Papaverin, mit den B-Werten in Abwesenheit von Papaverin ermittelt.

In der eben beschriebenen Weise wurden in jedem der fünf Spenderplasmen alle sieben Enzyme dreimal hintereinander durchgemessen, so dass am Ende der Versuche von jedem Enzym in der Regel 15 Werte für die Enzymaktivität mit und 15 Werte ohne Papaverin vorlagen.

Es wurde darauf geachtet, dass im Laufe der fünf Versuche die Reihenfolge der zur Bestimmung kommenden Enzyme öfters geändert wurde, damit die Aktivitätsverluste, die sich durch die Alterung der Plasmen im Laufe von Stunden möglicherweise einstellten, nicht immer auf die gleichen Enzyme entfielen.

4.4. Berechnung der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden nach der Formel

$$(1) \quad \frac{\text{Umrechnungsfaktor}}{\text{sec (Plasma } A_1 \text{ bzw. } B_1)} - \frac{\text{Umrechnungsfaktor}}{\text{sec (Plasma } A_2 \text{ bzw. } B_2)} = Y$$

$$(2) \quad \frac{Y \times 100}{55 \times \frac{\text{Zahl der Thrombozyten}}{\text{in Mill./mm}^3}} = x \text{ I.E./}10^{11} \text{ Thrombozyten}$$

ermittelt.

Danach erfolgte ihre Umrechnung auf I.E./ 10^{11} Thrombozyten

B. Statistische Methode

1. Einfache Datenbeschreibung

Die Datenbeschreibung dient der Charakterisierung des vorhandenen Zahlenmaterials. Aus ihr wird der Schwerpunkt einer Verteilung und ihrer Streuung ersichtlich [s. Tab. 4, S.23].

Der Mittelwert $\bar{x}$ stellt das arithmetische Mittel der durch Doppelbestimmungen ermittelten Enzymaktivitätswerte dar. Die Anzahl n der durchgeführten Doppelbestimmungen betrug in der Regel 15, in einem Fall 14, in einem anderen Fall 9.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Die Standardabweichung s ist das gebräuchlichste Mass der Streuung. Je kleiner der Wert s ist, desto näher liegen die ermittelten Werte beisammen. Die Standardabweichung s ist gleich der Wurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Abweichungen vom arithmetischen Mittel.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Standardabweichung der Mittelwerte $s_{\bar{x}}$ wird als Genauigkeitsmass der Mittelwerte ermittelt.

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

2. Statistische Verfahren

Mittels statistischer Verfahren wurden geprüft

- a) die Messgenauigkeit der angewandten Methode mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse,
- b) die mögliche Beeinflussung der Thrombozytenzahl durch die Gegenwart von Papaverin mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse und
- c) die mögliche Beeinflussung oder Hemmung eines oder mehrerer Enzyme des intrathrombozytären Kohlenhydratstoffwechsels in Gegenwart von Papaverin mit Hilfe des t-Tests für verbundene Stichproben.

2.1. Die Messgenauigkeit der angewandten Methode

Es sollte festgestellt werden, ob die Streuung der verschiedenen in einem Plasma bestimmten Thrombozytenzahlen geringer ist als die Streuung zwischen den Thrombozytenzahlen verschiedener Plasmen. Denn wäre die Streuung zwischen den Plasmen genauso gross wie innerhalb der Plasmen, dann wäre anzunehmen, dass die ermittelten Zahlen viel zu ungenau für eine weitere statistische Aufschlüsselung wären. Die Ergebnisse dieser Arbeit besässen dann keine Aussagekraft.

Zur Prüfung dieser Frage wurde die einfache Varianzanalyse herangezogen. Neun Versuchspersonen fungierten dabei als Gruppen, die jeweils fünf Thrombozytenzahlbestimmungen pro Spenderplasma als Gruppenglieder. Da die Versuche mit papaverinisierten und nicht-papaverinisierten Plasmen

durchgeführt worden waren, wurde auch für jede der beiden Plasmaarten eine eigene einfache Varianzanalyse erstellt (s. Tab. 5, S.24).

In einer Varianzanalyse werden die SAQ-Werte zwischen den Gruppen (SAQ_{zw}) und innerhalb der Gruppen (SAQ_{in}) bestimmt. Nach Division der SAQ-Werte durch die jeweiligen Freiheitsgrade FG erhält man die MAQ-Werte. Die Testgrösse F resultiert aus der Division von MAQ_{zw}/MAQ_{in} . Je grösser die Testgrösse F ist, desto geringer ist die Streuung innerhalb einer Gruppe verglichen mit der Streuung zwischen den Gruppen.

$$MAQ_{zw} = \frac{SAQ_{zw}}{l - 1}$$

$$MAQ_{in} = \frac{SAQ_{in}}{n - l}$$

- l = Anzahl der Gruppen
- n = Anzahl der Glieder einer Gruppe
- SAQ = Summe aller Abweichungsquadrate
- MAQ = Mittelwert aller Abweichungsquadrate
- l-1 = Freiheitsgrade zwischen den Gruppen
- n-l = Freiheitsgrade in den Gruppen

2.2. Beeinflussung der Thrombozytenzahl durch die Gegenwart von Papaverin

Bei der Berechnung der Enzymaktivitäten ist neben den ermittelten Zeitwerten für die Extinktionsänderung die Thrombozytenzahl des untersuchten Plasmas von grösster Bedeutung, weil sich die gemessenen Zeiten immer auf die

Plättchenzahl beziehen. Je niedriger die gefundene Thrombozytenzahl bei konstantem Zeitwert ausfällt, desto grösser ist die daraus resultierende Enzymaktivität (s. II.A.4.4., S. 17).

Bei dieser Sachlage war es deshalb notwendig, eine Veränderung der Plättchenzahl durch die Anwesenheit von Papaverin auszuschliessen. Zu diesem Zweck wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt, bei der zwei Gruppen bestehend aus je 44 Thrombozytenzahlen miteinander verglichen wurden. Die erste Gruppe bestand aus Zahlen, die in Plasmen ohne Papaverinzusatz ermittelt worden waren, die zweite aus Zahlen papaverinhaltiger Plasmen (s. Tab. 6, S. 25).

2.3. Die Änderung der Enzymaktivität in Gegenwart von Papaverin

Mit Hilfe des t-Tests für verbundene Stichproben wurde die Kernfrage der vorliegenden Arbeit, ob nämlich die Gegenwart von Papaverin eine Änderung der Enzymaktivitäten des intrathrombozytären Kohlenhydratstoffwechsels bewirke, der statistischen Analyse unterzogen. Dieses Verfahren war zur Analyse unserer Messwerte deshalb sehr geeignet, weil mit ihm geprüft werden kann, ob zwischen den Werten zweier Messreihen an einem Individuum bzw. in einem Plasma mehr als zufällige Unterschiede bestehen. Die Messreihen, zwischen denen nach einem statistischen Unterschied gesucht wurde, waren die Plasmen A und B der fünf Spender, bei denen A mit Papaverinzusatz und B ohne Papaverinzusatz gleichbedeutend ist.

Der t-Test für verbundene Stichproben vergleicht Messwerte A und B, die jeweils am gleichen Individuum festgestellt wurden, paarweise miteinander. So werden zunächst die

Differenzen d zwischen A und B gebildet, dann die Summe der Differenzen $\bar{d}$. Ist $\bar{d}$ verhältnismässig gross gegenüber der Streuung der Messwerte, so ist eine Signifikanz vorhanden. Die Testgrösse t berechnet sich aus dem Quotienten $\bar{d}/s_d \sqrt{n}$.

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d} \cdot \sqrt{n}$$

Da bei den Versuchen für jedes Enzym 15 (bzw. 14, bzw. 9) Messwerte einmal in Gegenwart, das andere Mal in Abwesenheit von Papaverin gefunden worden waren, liess sich für jedes Enzym die entsprechende Anzahl Zahlenpaare bilden, mit denen der t -Test durchgeführt werden konnte (s. Tab. 7, S.27).

III. Ergebnisse

1. Grundlegende Daten

An den Anfang seien die in der Arbeit bestimmten Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardabweichungen der Mittelwerte gestellt.

Enzyme	n	Enzymaktivitäten					
		mit Papaverin			ohne Papaverin		
		$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
Di-P-Frukto- aldolase	15	11,17	3,40	0,88	10,11	2,83	0,73
Glyzerinaldehyd- 3-P-Dehydrogenase	14	130,16	13,42	3,59	122,92	12,07	3,23
3-P-Glyzerat-1- Kinase	15	124,43	10,07	2,60	120,95	13,07	3,37
3-P-Glyzero- mutase	9	28,69	3,31	1,10	27,18	2,39	0,80
Enolase	15	38,45	1,94	0,50	35,22	1,04	0,27
Pyruvatkinase	15	148,24	25,86	6,68	125,93	17,41	4,50
Laktat- dehydrogenase	15	168,33	14,85	3,83	163,71	12,75	3,29

n = Anzahl der durch Doppelbestimmungen ermittelten Enzymaktivitätswerte

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung der Mittelwerte

Tab. 4. Einfache Datenbeschreibung der Enzymaktivitäten mit und ohne Papaverin

2. Ueberprüfung der angewandten Methode

Die Ueberprüfung der angewandten Methode wurde mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse vorgenommen. Die Testgrösse F, Quotient aus MAQ_{zw} und MAQ_{in} , belief sich im Falle des papaverinisierten Plasmas auf 77,59, im Falle des nicht-papaverinisierten Plasmas auf 37,16. In beiden Fällen ist damit die Streuung zwischen den Versuchspersonen signifikant grösser als die Streuung der ermittelten Thrombozytenzahlen innerhalb der Spenderplasmen. Das bedeutet, dass die in Zählkammern bestimmten Thrombozytenzahlen der verschiedenen Plasmen zuverlässig genug sind, um auf ihrer Basis zu einem klaren Ergebnis zu gelangen. Die angewandte Methode ist somit hinreichend genau (s. Tab. 5).

<u>Mit Papaverin</u>						
	Streuungsursache	SAQ	FG	MAQ	F	p
	zwischen den Gruppenmitteln	259.866	1-1= 8	32.483	77	++
	innerhalb der Gruppe	15.069	n-1=36	418		
	insgesamt	274.936	n-1=44			

<u>Ohne Papaverin</u>						
	Streuungsursache	SAQ	FG	MAQ	F	p
	zwischen den Gruppenmitteln	263.291	1-1= 8	32.911	37	++
	innerhalb der Gruppe	31.877	n-1=36	885		
	insgesamt	295.168	n-1=44			

- SAQ = Summe aller Abweichungsquadrate
 FG = Freiheitsgrade
 n = Anzahl der Glieder aller Gruppen
 l = Anzahl der Gruppen
 MAQ = Mittelwert aller Abweichungsquadrate
 F = Testgrösse der einfachen Varianzanalyse
 p = Irrtumswahrscheinlichkeit
 p 1 %: Testergebnis signifikant = ++
 p 5 %: Testergebnis auffällig = +
 p 5 %: Testergebnis negativ = -

Tab. 5. Einfache Varianzanalyse zur Ueberprüfung der angewandten Methode

3. Beeinflussung der Thrombozytenzahl durch Papaverin

Die Testgrösse F der hier durchgeführten einfachen Varianzanalyse besagt mit einem Wert von 0,57, dass zwischen den Streuungen der beiden Gruppen von Thrombozytenzahlen kein statistisch auffälliger Unterschied besteht, das heisst, dass der bestehende Unterschied im Rahmen der normalen Messfehlerbreite liegt. Damit ist bewiesen, dass Papaverin in der verwendeten Konzentration von ca. 5×10^{-4} M keine Minderung der Plättchenzahl, beispielsweise im Sinne einer Thrombozytolyse oder anders gearteter Zerstörung der Blutplättchen, hervorruft. Dadurch ist nachgewiesen, dass der Bezug auf die Thrombozytenzahl bei der Berechnung der Enzymaktivität nicht durch Papaverineinfluss gestört wird (s. Tab. 6).

Streuungsursache	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppenmitteln	2.574	1-1 = 1	2.574	0,57	-
innerhalb der Gruppe	386.950	n-1 = 86	4.499		
insgesamt	389.525	n-1 = 87			

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

FG = Freiheitsgrade

MAQ = Mittelwert der Abweichungsquadrate

F = Testgrösse

p = Irrtumswahrscheinlichkeit:

Testergebnis signifikant = ++

Testergebnis auffällig = +

Testergebnis negativ = -

Tab. 6. Einfache Varianzanalyse zum Ausschluss einer möglichen Beeinflussung der Thrombozytenzahl durch Papaverin

4. Enzymaktivitätsänderung in Gegenwart von Papaverin

Die Untersuchung der aus den Hauptversuchen resultierenden Enzymaktivitätswerten anhand des t-Tests für verbundene Stichproben ergab eine signifikante Erhöhung der Aktivitäten folgender vier Enzyme des intrathrombozytären Kohlenhydratstoffwechsels in Gegenwart von Papaverin (s. Tab. 7, S.27):

1. Di-Phosphat-Fruktoaldolase
2. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
3. Enolase
4. Pyruvatkinase

Die restlichen drei Enzyme 3-Phosphoglyzerat-1-Kinase, 3-Phosphat-Glyzeromutase und Laktatdehydrogenase waren statistisch unauffällig, das heisst, dass ihre Aktivitäten durch Papaverin unbeeinflusst blieben. Obwohl sie statistisch unauffällig waren, zeigte sich bei einem Zahlenvergleich ihrer Aktivitäten eine geringgradige Erhöhung der Werte in Gegenwart von Papaverin (s. Tab. 8, S.28).

Im vorliegenden Fall durfte das Prädikat "statistisch signifikantes Messergebnis" verwendet werden, wenn die Testgrösse t in Abhängigkeit von der Fallzahl n ($n=15$ bzw. $=14$ bzw. $=9$) einen Wert von 2,98 bzw. 3,01 bzw. 3,36 überschritten hatte oder ihm gleich war.

Enzyme	n	$\bar{d}$	s^2_d	t	p
Di-P-Frukto-aldolase	15	1,06	0,23	4,67	++ erhöht
Glyzerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	14	7,23	1,65	4,39	++ erhöht
3-P-Glyzerat-1-Kinase	15	3,49	2,25	1,55	-
3-P-Glyzero-mutase	9	1,51	0,93	1,63	-
Enolase	15	3,23	0,63	5,12	++ erhöht
Pyruvatkinase	15	22,31	2,95	7,55	++ erhöht
Laktat-dehydrogenase	15	4,62	3,48	1,33	-

n = Anzahl der durch Doppelbestimmungen ermittelten Enzymaktivitäten

$\bar{d}$ = Mittelwert der Differenzen

s^2_d = Varianz der Differenzen

t = Testgrösse des t-Tests; $t = \frac{\bar{d}}{sd} \cdot \sqrt{n}$

p = Irrtumswahrscheinlichkeit

++ = signifikantes Testergebnis

+ = auffälliges Testergebnis

- = negatives Testergebnis

Tabelle 7. t-Test mit verbundenen Stichproben zur Ueberprüfung möglicher Enzymaktivitätsänderungen in Gegenwart von Papaverin

Die prozentuale Erhöhung der Enzymaktivitäten in Gegenwart von Papaverin ist aus der Tabelle 8 ersichtlich. Dabei wurden die Durchschnittswerte der Enzymaktivitäten ohne Papaverin (s. Tab. 4, S.23) gleich 100 % gesetzt und die prozentuale Erhöhung der Durchschnittswerte der Enzymaktivitäten mit Papaverin berechnet.

Enzyme	Aktivitätserhöhung (rel.-%)
Di-P-Fruktoaldolase	10,4
Glyzerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	5,8
3-P-Glyzerat-1-Kinase	2,8
3-P-Glyzeromutase	5,5
Enolase	9,2
Pyruvatkinase	17,7
Laktatdehydrogenase	2,8

Tabelle 8. Erhöhung der Enzymaktivitätswerte in Gegenwart von Papaverin in rel.-% bezogen auf die Normalaktivitäten

IV. Diskussion der Ergebnisse

Die Hemmung verschiedener Thrombozytenfunktionen durch Papaverin ist eine bekannte, in ihrer Ursache jedoch noch ungeklärte Erscheinung. So konnte beispielsweise MARKWARDT (14) nachweisen, dass in Gegenwart von Papaverin in einer Konzentration von 10^{-4} bzw. 5×10^{-5} M folgende Plättchenfunktionen mehr oder weniger deutlich gehemmt werden:

- a. die Adhäsivität an Glasoberflächen,
- b. die durch ADP bewirkte Aggregation,
- c. die durch Thrombin ausgelöste visköse Metamorphose und
- d. die durch Thrombin und andere proteolytische Fermente bewirkte Freisetzung von Serotonin, Histamin und ATP.

In eigenen Vorversuchen konnte die von MARKWARDT beschriebene verminderte Adhäsivität von Thrombozyten an Glasoberflächen in Gegenwart von Papaverin bestätigt werden.

Verschiedene Plättchenfunktionen sind von einem intakten Stoffwechsel der Thrombozyten abhängig. So zeigten LOEHR, WALLER und GROSS (11), dass eine eindeutige Beziehung zwischen Retraktionsvermögen und ungestörtem Energiestoffwechsel der Thrombozyten besteht. Sie konnten nachweisen, dass durch Blockierung des für die Glykolyse sehr wichtigen Enzyms Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) die Retraktionsfähigkeit der Thrombozyten aufgehoben werden kann.

Weiterhin ist in Lagerungsversuchen (GROSS, LOEHR, WALLER (6), SEIDL (23)) festzustellen, dass mit dem Abnehmen des intrathrombozytären Enzymstoffwechsels eine Minderung der Plättchenadhäsivität und -aggregation einhergeht.

Es war daher naheliegend, der Frage nachzugehen, ob die in Gegenwart von Papaverin beobachteten Einschränkungen der Thrombozytenfunktionen nicht etwa mit einer Beeinträchtigung des Plättchenstoffwechsels zu erklären seien. So äusserte MARKWARDT (15) die Vermutung, dass die Hemmung der Plättchenfunktionen möglicherweise durch eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels zustande kommen könnte.

Wir haben es daher unternommen, einige Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in vitro auf ihre Beeinflussbarkeit durch Papaverin zu überprüfen. Hierzu bestimmten wir mit Hilfe der Plasmasubtraktionsmethode nach OHLER (19) die Aktivitäten von sieben Glykolyseenzymen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Papaverin.

In diesem Zusammenhang wurde auch der Frage nachgegangen, inwieweit der Zusatz von Papaverin zu einem thrombozytenreichen Plasma zu einer Verminderung der Thrombozytenzahl führt. Dies ist wegen der Art der Enzymaktivitätsberechnung im Rahmen der Plasmasubtraktionsmethode (OHLER (19)) von besonderer Bedeutung. Dabei ergab sich, dass die Thrombozytenzahl durch Papaverinzugabe nicht verändert wird.

Wie aus den Untersuchungsergebnissen hervorgeht, wurden die Enzyme Aldolase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Enolase und Pyruvatkinase (PK) statistisch signifikant durch Papaverin beeinflusst. Es kam zu einer

Erhöhung der Enzymaktivitäten in einer Größenordnung von 5,8 bis 17,7 %. Die restlichen drei gemessenen Enzyme zeigten dagegen keine statistisch auffällige Beeinflussung ihrer Aktivitäten durch Papaverin.

Dieses Ergebnis erlaubt nicht, die durch Papaverin verursachten Einschränkungen der Thrombozytenfunktionen mit einer Hemmung der intrathrombozytären Glykolyse zu erklären, da ja im Gegenteil im papaverinhaltigen Plasma eine erhöhte Aktivität der glykolytischen Enzyme gefunden wurde. Papaverin wirkt demnach für die gemessenen Enzyme nicht inhibierend, sondern steigert im Gegenteil die Aktivität. Daher stellte sich uns die Frage, ob die Papaverinwirkung nicht durch das Eintreten des Pasteur-Effekts erklärt werden könnte, bei dem der Glukose-Durchsatz erhöht, die Energiebereitstellung (ATP) aber nicht erhöht wird, sondern eher abnimmt.

Von verschiedenen Substanzen ist bekannt, dass sie in den oxydativen Stoffwechsel eingreifen. So wurde von GROSS und SCHNEIDER (5) berichtet, dass Kaliumzyanid den intrathrombozytären oxydativen Stoffwechsel hemmt, und dass es durch Eintreten des Pasteur-Effektes zur gesteigerten Glykolyse kommt. Der ATP-Spiegel nimmt dabei ab. Im gleichen Zusammenhang wurde über Dinitrophenol berichtet, das ebenfalls über den Pasteur-Effekt einen erhöhten Glykolysefluss hervorruft, wobei allerdings der ATP-Spiegel nahezu normal bleibt. Nach KARLSON (8) wird hierbei zwar die Atmung stimuliert, die Bildung von ATP aber verhindert. Nach einer Beobachtung von JAHRMAERKER (7) soll durch ein erhöhtes Angebot von anorganischem Phosphat eine Steigerung der Glykolyse hervorgerufen werden.

Auch bei Betrachtung der bei einigen Thrombozytenerkrankungen gefundenen Enzymaktivitätswerten war auffällig, dass die

Enzymspiegel nicht immer, wie man eigentlich erwarten könnte, unter der Norm lagen, sondern teilweise unerklärlicherweise erhöht waren. So kann nach LOEHR (12) bei der Thrombasthenie GLANZMANN-NAEGELI neben dem Typ I, der eine Erniedrigung des ATP-Spiegels, des Laktat-Spiegels, der GAPDH-Aktivität und des Glukoseverbrauchs aufweist, ein Typ II mit hochnormalen ATP-Werten und teilweise gesteigerten Enzymwerten beobachtet werden. Trotz ihrer auffälligen biochemischen Differenz zeigen beide Typen eine Einschränkung der Adhäsivität und Aggregation der Blutplättchen sowie ein Unvermögen zur Gerinnselfretraktion. Ebenso zeigte sich bei der Durchsicht der von OHLER (18) gemessenen Enzymwerte bei Thrombozytosen, essentiellen und symptomatischen Thrombozytopenien und Thrombozytopathien nicht immer ein einheitliches Bild im Sinne einer immer wiederkehrenden intrathrombozytären Enzymaktivitätsminderung, sondern auch hier konnte bei einzelnen Patienten eine Erhöhung ihrer Enzymwerte festgestellt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass es Fälle von Thrombozytopathien gibt, die mit einer gesteigerten Glykolyse einhergehen. Dies könnte aber mit einem gleichzeitig bestehenden hohen Gehalt jugendlicher Thrombozyten im peripheren Blut in Zusammenhang gebracht werden (20).

Bei Betrachtung der bekannten Papaverinwirkungen fällt auf, dass ausser der spasmolytischen Wirkung auf die glatte Muskulatur, wie zum Beispiel Koronargefässe, Hirngefässe, Magen-Darm-Kanal, Uterus, Bronchien, Gallen- und Harnwege (10), in der Literatur nur wenig über die Beeinflussung biochemischer Reaktionen durch Papaverin berichtet wird. Ueber die für uns besonders interessante Frage, nämlich das Verhalten des Kohlenhydratstoffwechsels in Gegenwart von Papaverin, konnten wir keine Literaturhinweise finden, mit deren Hilfe unsere Ergebnisse erklärt werden konnten.

Interessant in diesem Zusammenhang war eine Mitteilung von MARKWARDT und HOFFMANN (16), wonach Papaverin eine für den Abbau von Adenosin-3',5'-monophosphat (=zyklisches AMP) wichtige spezifische Phosphodiesterase (=PDE) hemmt und dadurch die Konzentration des zyklischen AMP steigt. Nach MARQUIS, VIGDAHL und TAVORMINA (17) kann aber die Aggregation menschlicher Blutplättchen von zyklischem AMP und seinen Dibutyryl-Derivaten inhibiert werden. Dies würde bedeuten, dass die von MARKWARDT beschriebenen Funktionsverluste von Thrombozyten in Gegenwart von Papaverin (14) durch die Konzentrationserhöhung des zyklischen AMP infolge der PDE-Hemmung durch Papaverin erklärt werden könnten.

Wie bekannt ist, wird im Muskel und in der Leber durch das zyklische AMP eine schwach aktive Phosphorylase b in eine hochaktive Phosphorylase a unter Verbrauch von ATP umgewandelt. Diese Phosphorylase a wirkt glykogenolytisch, indem Glykogen in Glucose-1-Phosphat überführt wird, welches durch Umlagerung in Glucose-6-Phosphat in die Glykolyse eingeschleust werden kann.

Man könnte sich nun vorstellen, dass die von uns festgestellte teilweise Steigerung der Glykolyse auf diesen Mechanismus, somit auf die erhöhte Konzentration des zyklischen AMP, zurückzuführen ist. Doch erklärt dies nicht, warum nur vier der untersuchten sieben Enzymaktivitäten, und nicht alle, erhöht waren.

Eine andere mögliche Erklärung unsres Ergebnisses wäre die, dass nur einzelne Glykolyseenzyme durch eine Konzentrationserhöhung des zyklischen AMP betroffen werden. Nach RAPOPORT (21) wird die Fruktokinase, die von uns nicht untersucht wurde, in ihrer Aktivität von Phosphat, Adenosin-Di-Phosphat und zyklischem AMP gesteigert. Das dadurch in erhöhter Konzentration anfallende Produkt Fruktose-1,6-Di-Phosphat

könnte eine vermehrte Aktivität der dieses Produkt spaltenden Frukto-Aldolase nach sich ziehen. Die von uns untersuchte Frukto-Aldolase zeigte eine signifikante Erhöhung ihrer Aktivität (s. Tab. 7, S.27). Von den restlichen drei in ihrer Aktivität signifikant erhöhten Enzyme ist eine Beeinflussung durch zyklisches AMP nicht bekannt, doch fällt auf, dass es sich bei zwei dieser drei Enzyme um Enzyme der Substratkettenphosphorylierung handelt, also um Enzyme, die durch die Gegenwart von Phosphat oder Adenosin-Di-Phosphat aktiviert werden. Es sind dies die Enzyme Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase. Das vierte und letzte in seiner Aktivität signifikant erhöhte Enzym ist die Enolase, die möglicherweise deshalb aktiviert wird, weil das von ihr gebildete Produkt gleichzeitig das Substrat der beschleunigten Pyruvatkinase ist, und sie deshalb durch erhöhte Aktivität die Konzentration ihres Produktes aufrecht zu erhalten sucht.

Da das gesamte intrathrombozytäre Stoffwechselgeschehen, sowohl biochemisch als auch strukturell noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist, lässt sich über die Deutung unseres Ergebnisses keine genauere Aussage machen. So lassen sich noch keine endgültigen Brücken schlagen zwischen den hier vorgelegten Ergebnissen, den Mitteilungen MARKWARDT's (14,16) und der geradezu offensichtlichen Parallelität zwischen der Papaverinwirkung auf den Muskel und auf die Thrombozyten, wenn man davon ausgeht, dass in beiden Fällen ein durch ATP aktivierbares kontraktiles Protein, Aktomyosin und Thrombosthenin (13), in Gegenwart von Papaverin die Kontraktions- bzw. Retraktionsfähigkeit verliert.

V. Zusammenfassung

1. Es wurden zur Klärung der Papaverinwirkung auf den Thrombozytenstoffwechsel sieben intrathrombozytäre Enzyme der Glykolyse untersucht.
2. Dabei wurde festgestellt, dass die Aktivitäten der
 - a. Di-Phosphat-Fruktoaldolase,
 - b. Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase,
 - c. Enolase und
 - d. Pyruvatkinasesignifikant erhöht waren.
3. Aus diesen Befunden darf geschlossen werden, dass die Hemmung der Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen durch Papaverin nicht auf einer inhibierenden Wirkung auf die gemessenen Enzyme beruht.
4. Als mögliche Interpretation der Befunde wird die Frage diskutiert, ob Papaverin über eine Hemmung der Phosphodiesterase die Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats erhöht, von dem bekannt ist, dass es die Aggregation menschlicher Blutplättchen hemmt und dass in seiner Gegenwart das Schrittmacherenzym der Glykolyse, die Phosphofruktokinase, aktiviert wird.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 BEISENHERZ, G. H.J. BOLTZE, Th. BUECHER, R. CZOK,
K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER:
Diphosphofructo-Aldolase, Phosphoglyceraldehyddehydro-
genase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-
dehydrogenase und Pyruvatkinase in einem Arbeitsgang
Z. Naturforsch. 86, 555 (1953)

- 2 BUECHER, Th.:
Enolase from Brewer's Yeast.
Methods in Enzymology: Band I, S. 427. New York, 1955

- 3 BUECHER, Th., W. LUH und D. PETTE:
Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit
Pyridinnucleotiden. 1,6-Di-Fructo-Aldolase. In:
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen
Analyse.
Herausgeber: K. Lang, E. Lehnarzt, O. Hoffmann-Ostenhof,
G. Siebert. 6. Band, Teil A. S. 292
Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, 1964

- 4 DELBRUECK, A., E. ZEBE und Th. BUECHER:
Ueber die Verteilungsmuster von Enzymen des energie-
liefernden Stoffwechsels in Flugmuskel, Sprungmuskel
und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre
cytologische Zuordnung.
Biochem. Z. 331, 273 (1959)

- 4a FEISSLY und LUEDIN:
Methode zitiert in MUELLER-SEIFERT, Thrombozytenzählung,
S. 573, 1966

- 5 GROSS, R. und W. SCHNEIDER:
Neuere Untersuchungen über den Stoffwechsel der
Thrombozyten. In:
Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten
und Thrombozyten.
Herausgeber: E. Deutsch, E. Gerlach und K. Moser,
S. 206 ff., Stuttgart, 1968
- 6 GROSS, R., G.W. LOEHR und H.W. WALLER:
Long term preservation of functionally intact platelets.
Proc. VIIth Congr. europ. Soc. Haemat. Teil II,
S. 686 (1960)
- 7 JAHRMAERKER, H.:
Beobachtungen bei der Phosphat-Aktivierung der
Erythrocyten-Glykolyse. In:
Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten
und Thrombozyten.
Herausgeber: E. Deutsch, E. Gerlach und K. Moser,
S. 19 ff., Stuttgart, 1968
- 8 KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart 1967, S. 175
- 9 KUBOWITZ, F. und P. OTT:
Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes
aus Tumoren.
Biochem. Z. 314, 94 (1943)
- 10 KUSCHINSKY, G. und H. LUELLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, Stuttgart, 1967 S. 37

- 11 LOEHR, G.W., H.D. WALLER und R. GROSS:
Beziehung zwischen Plättchenstoffwechsel und
Retraktion des Blutgerinnsels unter besonderer
Berücksichtigung der Thrombozytopathie Glanzmann-
Naegeli.
Dtsch. med. Wschr. 86, 879 und 946 (1961).
- 12 LOEHR, G.W.:
Der Stoffwechsel des normalen und pathologischen
Thrombozyten. In:
Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten
und Thrombozyten.
Herausgeber: E. Deutsch, E. Gerlach und K. Moser,
Seite 196 ff., Stuttgart, 1968
- 13 LUESCHER, E.F. und BETTEX-GALLAND, M.:
Properties and Functional Significance of the
Contractile Protein of the Blood Platelets. In:
Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten
und Thrombozyten.
Herausgeber: E. Deutsch, E. Gerlach und K. Moser,
S. 247 ff., Stuttgart, 1968
- 14 MARKWARDT, F., W. BARTHEL, E. GLUSA und A. HOFFMANN:
Der Einfluss von Papaverin auf Funktionen der Blut-
plättchen.
Experientia (Basel) 22, 578 (1966)
- 15 MARKWARDT, F.:
Persönliche Mitteilung, Hamburg, 1969

- 16 MARKWARDT, F. und A. HOFFMANN:
Effects of papaverine derivatives on cyclic AMP
phosphodiesterase of human platelets.
Bioch. Pharm. Vol. 19, pp. 2519-2520, 1970
- 17 MARQUIS, N.R., R.L. VIGDAHL und P.A. TAVORMINA:
Biochem. biophys. Res. Commun. 36, 965 (1969)
- 18 OHLER, W.G.A.:
Die klinische Bedeutung der intrathrombozytären
Fermente des Kohlenhydratstoffwechsels.
Med. Hab., Mainz, 1966
- 19 OHLER, W.G.A.:
Die Verwendung thrombozytenreichen Plasmas zur Be-
stimmung intrathrombozytärer Enzyme.
Therapiewoche 18, 47, 2115 (1968)
- 20 OHLER, W.G.A.:
Ergebnisse und Bedeutung von Enzymbestimmungen an
Thrombozyten.
Klin. Wschr. 46, 737 (1968)
- 21 RAPOPORT, S.M.:
Medizinische Biochemie, Berlin, 1966, S. 368-371
- 22 SCHNEIDER, W., C. DOENECKE, P.G. SCHEURLIN und R. GROSS:
Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Acetylsalicylsäure.
Med. Welt 22 (N.F.) 1262- 1267 (1971)

23 SEIDL, S.:

Die Thrombozytentransfusion. S. 18 ff.
Stuttgart, 1968

24 VOGELL, W., F.R. BISHAI, Th. BUECHER, M. KLINGENBERG,
D. PETTE und E. ZEBE:

Ueber strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln
von *Locusta migratoria*.
Biochem. Z. 332, 81 (1959)

25 WALLER, H.D.:

Mitteilung und Anleitung über die Enzymbestimmungen
in Blutzellen an W. OHLER. Tübingen, 1964

Für die Ueberlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Lösung der gestellten Probleme danke ich Herrn Professor Dr. med. W. Ohler in Mainz vielmals. Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. W. Ehrenberg-Kieckebusch vom Statistischen Institut in Mainz für die hilfreiche Beratung bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Arbeit.

VII. Lebenslauf

Am 20.9.1945 wurde ich, Manfred Schmidt, als einziger Sohn des Kaufmanns Heinrich Schmidt und seiner Ehefrau Ursula, geb. Lehmann, in Arnzburg, Kreis Giessen, geboren.

Nach dem Tode meines Vaters im Jahre 1950 zog ich mit meiner Mutter nach Griesheim, Kreis Darmstadt, um. Dort heiratete meine Mutter den praktischen Arzt Dr. med. Erich Sauer.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich in Griesheim die Volksschule, von 1956 bis 1965 das altsprachliche Ludwig-Georgs-Gymnasium in Darmstadt, an dem ich im Frühjahr 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Nach zwölfmonatigem Wehrdienst immatrikulierte ich mich am 1.5.1966 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Da ich nicht sofort für das Studienfach Medizin zugelassen wurde, studierte ich zwei Semester Biologie, von denen mir ein Semester auf mein Medizinstudium angerechnet wurde.

Nach dem Sommersemester 1967 bestand ich das Vorphysikum, nach dem Wintersemester 1968/69 das Physikum.

Im Sommersemester 1969 begann mein klinisches Studium in den Universitätskliniken in Mainz. Z. Zt., nach Abschluss des sechsten klinischen Semesters, bereite ich mich auf das Staatsexamen vor.

Seit dem 19.3.1971 bin ich mit der Arztsekretärin Marita Schmidt, geb. Palmer, verheiratet.

